

UPLC-MS/MS法测定复方地黄合剂中10种指标性成分的含量

刘红霞, 孙延文, 韩菲, 周妍, 孙华君, 丁丽琴

Quantitative analysis of 10 components in Compound Dihuang oral solution by UPLC-MS/MS

LIU Hongxia, SUN Yanwen, HAN Fei, ZHOU Yan, SUN Huajun, DING Liqin

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202312068>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

HPLC-MS/MS测定当归六黄汤中4种不同成分的含量

Determination of four different components in Danggui Liu Huang decoction by HPLC-MS/MS

药学实践与服务. 2024, 42(6): 248-252, 266 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202305007](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202305007)

UPLC-MS/MS法测定小鼠血浆中紫杉醇脂肪酸酯前药及其药代动力学研究

Determination and pharmacokinetics investigation of prodrugs of paclitaxel fatty acid esters in mouse plasma by UPLC-MS/MS

药学实践与服务. 2024, 42(8): 341-345 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202404082](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202404082)

HPLC-MS/MS同时测定感冒安颗粒中5种黄酮成分的含量

Simultaneous determination of five flavonoids in Ganmao' an granules by HPLC-MS/MS

药学实践与服务. 2024, 42(9): 402-406 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202403030](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202403030)

滴眼液中抑菌剂硫柳汞的HPLC含量测定方法研究

Determine antimicrobial preservatives thimerosal in eye drops by HPLC

药学实践与服务. 2025, 43(6): 293-297 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202404059](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202404059)

核磁共振磷谱法测定磷酸氢钙咀嚼片中药物含量

Determination of phosphorus content in calcium hydrogen phosphate tablets by ^{31}P -qNMR

药学实践与服务. 2024, 42(9): 399-401, 406 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202404063](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202404063)

血通胶囊提取工艺优化及质量控制研究

Extraction process optimization and quality control of Xuetong capsules

药学实践与服务. 2025, 43(2): 82-86, 91 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202409003](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202409003)



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

UPLC-MS/MS 法测定复方地黄合剂中 10 种指标性成分的含量

刘红霞¹, 孙延文^{2,3}, 韩 菲^{2,3}, 周 妍^{2,3}, 孙华君¹, 丁丽琴^{2,3} (1. 上海市儿童医院, 上海交通大学医学院附属儿童医院药学部, 上海 200062; 2. 天津中医药大学中医药研究院, 天津 301617; 3. 天津市中药功效物质重点实验室, 天津 301617)

【摘要】 目的 建立超高效液相色谱串联质谱法(UPLC-MS/MS)同时测定复方地黄合剂中小檗碱、黄柏碱、特女贞苷、芒果苷、莫诺苷、马钱苷、芍药苷、栀子苷、黄芩苷和毛蕊花糖苷 10 种成分的含量。**方法** 采用 UPLC-MS/MS 法, 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH-C18(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水(A)-甲醇(B), 梯度洗脱, 流速为 0.2 ml/min, 柱温 30℃, 进样量 2 μl。采用多反应离子检测模式(MRM)。**结果** 复方地黄合剂中 10 种成分在各自浓度范围内线性关系良好, 精密度、重复性、稳定性和加样回收率结果均符合要求; 7 批次样品中小檗碱、黄柏碱、特女贞苷、芒果苷、莫诺苷、马钱苷、芍药苷、栀子苷、黄芩苷和毛蕊花糖苷的含量分别为(89.7~95.6) μg/ml、(164.0~177.7) μg/ml、(540.0~610.0) μg/ml、(408.7~429.0) μg/ml、(726.0~825.0) μg/ml、(503.7~572.0) μg/ml、(1380.0~1540.0) μg/ml、(2596.7~2896.7) μg/ml、(4866.7~5520.0) μg/ml、(61.8~67.2) μg/ml。**结论** 该方法重复性好、操作简便, 可快速准确地测定复方地黄合剂中 10 种成分的含量, 并为其质量控制提供参考。

【关键词】 复方地黄合剂; 超高效液相色谱串联质谱法; 含量测定

【文章编号】 2097-2024(2025)08-0390-05

【DOI】 10.12206/j.issn.2097-2024.202312068

Quantitative analysis of 10 components in Compound Dihuang oral solution by UPLC-MS/MS

LIU Hongxia¹, SUN Yanwen^{2,3}, HAN Fei^{2,3}, ZHOU Yan^{2,3}, SUN Huajun¹, DING Liqin^{2,3} (1. Department of Pharmacy, Shanghai Children's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200062, China; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 3. Tianjin Key Laboratory of Therapeutic Substance of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

【Abstract】 Objective To develop an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method to simultaneously determine 10 main components, including berberine, phellodendrine, specnuezhenide, mangiferin, loganin, paeoniflorin, geniposide, baicalin, and acteoside in Compound Dihuang oral solution. **Methods** An UPLC-MS/MS method was established with an ACQUITY UPLC BEH-C18 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) column and mobile phase of 0.1% formic water(A)-methanol solution(B) in a gradient elution manner. The flow rate of mobile phase was 0.2 ml/min. The temperature of column was 30℃. The injection volume was 2 μl. The MS detection was in MRM mode. **Results** 10 components in Compound Dihuang oral solution had a good linear relationship within their concentration range, and the precision, repeatability, stability and recovery met the requirements. The contents of berberine, phellodendrine, specnuezhenide, mangiferin, loganin, paeoniflorin, geniposide, baicalin, and acteoside in 7 batches of samples were (89.7-95.6) μg/ml, (164.0-177.7) μg/ml, (540.0-610.0) μg/ml, (408.7-429.0) μg/ml, (726.0-825.0) μg/ml, (503.7-572.0) μg/ml, (1380.0-1540.0) μg/ml, (2596.7-2896.7) μg/ml, (4866.7-5520.0) μg/ml, (61.8-67.2) μg/ml, respectively. **Conclusion** The established method was easy to be repeated and operated. The contents of 10 components in Compound Dihuang oral solution could be determined quickly and accurately, which provided a reference for the quality control of hospital preparation.

【Key words】 Compound Dihuang oral solution; UPLC-MS/MS; quantitative determination

【基金项目】 上海交通大学医学院高水平地方高校建设项目(二期)(2022zxy008); 上海市药学会上海青年药学会人才能力提升项目(沪药学会字[2023]04号)

【作者简介】 刘红霞, 副主任药师, 研究方向: 临床药学及临床药理, Email: lhx64597846@163.com

【通信作者】 丁丽琴, 副研究员, 研究方向: 中药药效物质基础及中药体内代谢研究, Email: ruby70303@163.com

性早熟是儿童常见的内分泌疾病, 女童主要表现为 8 岁前出现第二性征发育或 10 岁前月经来潮。青春期提前可导致发育进程加速、骨骼提前闭合, 进而影响儿童成年后的身高^[1-2]。目前性早熟发病率呈逐年上升的趋势。中医将性早熟分为 3 个证型, 其中以阴虚火旺型最为常见^[3]。

复方地黄合剂是上海市儿童医院的院内制剂,

于 20 世纪 90 年代开始应用于临床,由知母、黄柏、生地黄、制山茱萸、赤芍、泽泻、茯苓、熟地黄、黄芩片、制女贞子、制香附、焦栀子、广郁金和当归 14 味中药组成,具有滋阴泻火,理气活血的功效,用于阴虚火旺型女童真性性早熟的辅助治疗^[4-7]。目前文献多采用高效液相色谱法(HPLC)测定复方地黄合剂中黄芩苷的含量^[5,7],存在检测指标单一,质量控制不全面,分析时间较长,灵敏度相对低等缺点。本研究采用超高效液相色谱串联质谱法(UPLC-MS/MS)同时测定了复方地黄合剂中 10 种成分的含量,具有灵敏度高、重现性好、稳定易操作的特点,以为复方地黄合剂的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

十万分之一天平 CPA225D 型[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];涡旋混合机 TYXH-II(天悦电子);5427R 高速离心机(Eppendorf);10~1 000 μ l 可调式移液器(Eppendorf);Waters ACQUITYTM UPLC 超高效液相色谱仪(Waters);TRIPLE QUAD 5500 三重四级杆质谱仪(SCIEX)。

1.2 药物与试剂

小檗碱(货号: B21379, >98%)、芒果苷(货号: B20837, >98%)、马钱苷(货号: B20822, >98%)、栀子苷(货号: B21661, >98%)(上海源叶生物科技有限公司);黄柏碱(批号: 111896-201805)、莫诺苷(批号: 111998-202205)、芍药苷(批号: 110736-202246)、黄芩苷(批号: 110715-202223)、特女贞苷纯度(>98%)、毛蕊花糖苷(>98%)(天津众合生物科技有限公司);复方地黄合剂(批号: 230903、230906、230908、231001、231002、231006、231101, 上海美优制药有限公司)。

甲醇(色谱纯, Sigma-Aldrich);水(超纯水, 屈臣氏)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH-C18(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m);流动相: 0.1% 甲酸水(A)-甲醇(B), 梯度洗脱, 程序见表 1;柱温: 35 $^{\circ}$ C;样品室温度: 15 $^{\circ}$ C;流速: 0.3 ml/min;进样量: 2 μ l。

2.2 质谱条件

AB Sciex TRIPLE QUAD 5500 三重四级杆质谱, 正负离子模式分析, 多反应监测(MRM)扫描方式;离子源电压: 5 500 V;离子源温度: 500 $^{\circ}$ C。MRM 方法参数见表 2。

表 1 色谱洗脱条件

时间(<i>t</i> /min)	A(%)	B(%)
0.0	95	5
2.0	60	40
7.0	55	45
8.0	3	97
10.0	0	100
10.1	95	5
12.0	95	5

表 2 10 种成分质谱参数

成分	离子源模式	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	去簇电压(DP/V)	碰撞能量(CE/V)
小檗碱	+	336.1	320.2	60.0	41.0
黄柏碱	+	342.3	192.3	15.0	32.0
特女贞苷	+	709.4	547.1	20.0	42.0
芒果苷	-	421.2	301.0	19.1	39.1
莫诺苷	-	451.2	243.0	20.0	23.0
马钱苷	-	435.3	227.0	64.3	18.6
芍药苷	-	524.9	449.2	80.0	20.0
栀子苷	-	433.1	225.1	34.0	20.0
黄芩苷	-	445.1	269.0	41.0	32.0
毛蕊花糖苷	-	623.1	161.1	190.0	46.0

2.3 溶液的配制

2.3.1 对照品溶液

精密称取小檗碱、黄柏碱、特女贞苷、芒果苷、莫诺苷、马钱苷、芍药苷、栀子苷、黄芩苷、毛蕊花糖苷对照品适量,用 50% 甲醇/水分别配制成 1.0 mg/ml 的对照品储备液。置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱。精密吸取各对照品储备液适量,用 50% 甲醇/水逐级稀释成 6 个不同浓度梯度的混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液

取复方地黄合剂 1 ml, 14 000 r/min 离心取上清 10 μ l, 加入 50% 甲醇/水 990 μ l, 涡旋 3 min, 14 000 r/min 离心取上清 10 μ l, 加入 50% 甲醇/水 990 μ l, 即得供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性

以上述色谱条件和质谱条件进样分析,小檗碱、黄柏碱、特女贞苷、莫诺苷、芒果苷、栀子苷、马钱苷、芍药苷、毛蕊花糖苷和黄芩苷的保留时间分别为 2.55、4.04、4.29、2.76、3.09、3.16、3.26、3.33、3.66、6.51 min, 峰形良好, 基线平稳。表明在此色谱和质谱条件下, 复方地黄合剂中其他成分对测定结果无干扰, 见图 1。

2.4.2 线性关系

吸取“2.3.1”项下混合对照品溶液, 取各个浓度进样分析, 以对照品峰面积(*Y*)为纵坐标, 对照品浓度(*X*)为横坐标做线性回归, 得标准曲线方程。将

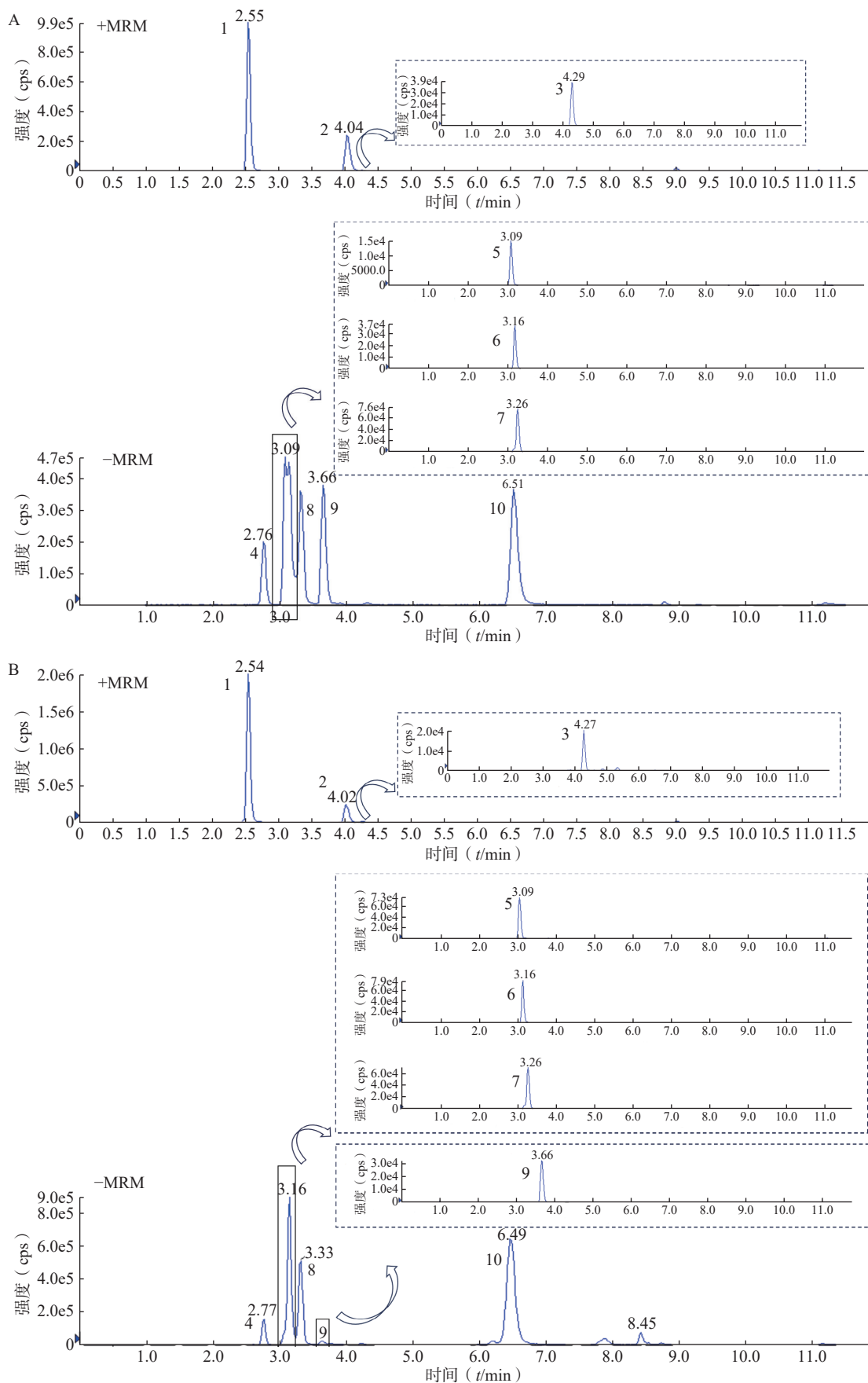


图 1 10 种成分的色谱图

A. 对照品溶液色谱图; B. 供试品溶液色谱图

注: 1. 小檗碱; 2. 黄柏碱; 3. 特女贞苷; 4. 莫诺苷; 5. 芒果苷; 6. 梔子苷; 7. 马钱苷; 8. 芍药苷; 9. 毛蕊花糖苷; 10. 黄芩苷。

标准曲线中最低浓度的混合对照品溶液逐步稀释, 分别以 $S/N=3$ 和 $S/N=10$ 时各对照品的浓度作为

检测限(LOD)和定量限(LOQ)。10 种成分在各自浓度范围内线性关系良好(表 3)。

表 3 10 种成分的标准曲线回归方程

化合物	线性方程	r	线性范围(ng/ml)	LOD(ng/ml)	LOQ(ng/ml)
小檗碱	$Y=104\ 000X+19\ 800$	0.999 2	5 ~ 200	0.003	0.008
黄柏碱	$Y=391\ 000X+37\ 700$	0.997 2	2 ~ 100	0.031	0.125
特女贞苷	$Y=240X-225$	0.996 1	5 ~ 200	0.125	0.250
芒果苷	$Y=1\ 290X-1\ 890$	0.999 0	2 ~ 100	0.063	0.125
莫诺苷	$Y=5\ 460X+35$	0.999 2	2 ~ 200	0.125	0.250
马钱苷	$Y=1\ 890X+225$	0.999 3	2 ~ 100	0.125	0.250
芍药苷	$Y=8\ 910X-1\ 060$	0.999 1	10 ~ 500	0.125	0.250
栀子苷	$Y=8\ 600X+453$	0.999 5	10 ~ 500	0.125	0.250
黄芩苷	$Y=1\ 250X+5\ 080$	0.996 0	50 ~ 1 000	0.250	1.000
毛蕊花糖苷	$Y=8\ 350X-1\ 760$	0.998 4	2 ~ 100	0.003	0.008

2.4.3 精密度

取批号为 230906 的复方地黄合剂, 按“2.3.2”项下制备供试品溶液, 以上述色谱条件和质谱条件进样分析, 重复进样 6 次, 记录各对照品的浓度, 并计算其相对标准偏差(RSD)值。结果显示, 小檗碱、黄柏碱、特女贞苷、芒果苷、莫诺苷、马钱苷、芍药苷、栀子苷、黄芩苷、毛蕊花糖苷 10 种成分的峰面积 RSD 分别为 1.1%、1.5%、1.9%、1.3%、2.7%、1.2%、1.0%、2.0%、0.8%、0.9%, 表明该仪器的精密度良好。

2.4.4 重复性

取批号为 230906 的复方地黄合剂, 按“2.3.2”项下制备供试品溶液 6 份, 以上述色谱条件和质谱条件进样分析, 记录各对照品的浓度, 并计算其 RSD 值。结果显示, 小檗碱、黄柏碱、特女贞苷、芒果苷、莫诺苷、马钱苷、芍药苷、栀子苷、黄芩苷、毛蕊花糖苷 10 种成分的峰面积 RSD 分别为 1.8%、3.8%、4.1%、1.4%、2.0%、1.8%、2.0%、3.1%、2.4%、2.1%, 表明该方法的重复性良好。

2.4.5 稳定性

取批号为 230906 的复方地黄合剂, 按“2.3.2”项下制备供试品溶液 1 份, 分别于 0、4、8、12、24 h 进样, 测得各对照品的浓度, 考察样品在进样器中放置稳定性, 计算其 RSD 值。结果表明样品中小檗碱、黄柏碱、特女贞苷、芒果苷、莫诺苷、马钱苷、芍药苷、栀子苷、黄芩苷和毛蕊花糖苷的 RSD 分别为 2.0%、3.6%、3.8%、0.9%、2.0%、1.9%、3.9%、3.9%、2.5%、2.8%, 表明在进样器中放置 24 h 稳定性良好。

2.4.6 加样回收率

吸取批号为 230906 的复方地黄合剂已知含量

样品 1 ml, 分别精密加入小檗碱、黄柏碱、特女贞苷、芒果苷、莫诺苷、马钱苷、芍药苷、栀子苷、黄芩苷和毛蕊花糖苷的对照品溶液适量, 14 000 r/min 离心取上清 5 μ l, 加入 995 μ l 50% 甲醇/水, 涡旋, 14 000 r/min 离心取上清 10 μ l, 加入 990 μ l 50% 甲醇/水, 涡旋, 14 000 r/min 离心取上清 200 μ l, 平行制备 6 份, 按上述色谱条件和质谱条件进样分析, 计算平均加样回收率和 RSD。结果表明样品中小檗碱、黄柏碱、特女贞苷、芒果苷、莫诺苷、马钱苷、芍药苷、栀子苷、黄芩苷和毛蕊花糖苷的平均加样回收率分别为 93.2%、108.7%、112.1%、106.7%、106.2%、106.9%、104.8%、103.8%、104.4%、86.7%, RSD 分别为 1.9%、0.9%、3.3%、3.5%、2.7%、3.6%、3.0%、3.0%、3.5%、1.8%, 表明该方法的回收率良好。

2.5 样品测定

7 批次复方地黄合剂按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 以上述色谱条件和质谱条件进样测定, 计算小檗碱、黄柏碱、特女贞苷、芒果苷、莫诺苷、马钱苷、芍药苷、栀子苷、黄芩苷和毛蕊花糖苷的含量, 平行测定 3 次, 结果见表 4。

3 讨论

3.1 指标性成分的选择

本实验所选择的指标性成分以复方地黄合剂的配伍和药典各中药的含量测定指标性成分为基准, 结合文献, 最终选择 10 种能代表复方地黄合剂的指标性成分进行含量测定研究。

3.2 色谱条件的选择

本实验分别考察了 0.1% 甲酸水-甲醇和 0.1% 甲酸水-乙腈作为流动相对 10 种成分分离效果的

表 4 复方地黄合剂中 10 种成分的含量测定结果 ($\mu\text{g/ml}$, $n=3$)

化合物	批号						
	230903	230906	230908	231001	231002	231006	231101
小檗碱	92.0	91.1	94.2	91.2	95.6	91.4	89.7
黄柏碱	164.7	168.7	177.7	173.0	173.7	177.0	164.0
特女贞苷	610.0	540.0	566.3	571.7	608.0	558.7	595.3
芒果苷	416.7	408.7	409.3	412.3	424.0	417.7	429.0
莫诺苷	749.7	795.3	793.0	745.7	795.3	825.0	726.0
马钱苷	549.3	540.7	566.3	550.0	572.0	531.3	503.7
芍药苷	1 490.0	1 506.7	1 496.7	1 473.3	1 540.0	1 480.0	1 380.0
栀子苷	2 596.7	2 666.7	2 803.3	2 810.0	2 896.7	2 713.3	2 630.0
黄芩苷	4 866.7	5 193.3	5 230.0	5 403.3	5 520.0	5 293.3	5 123.3
毛蕊花糖苷	62.7	65.6	66.9	64.1	67.2	64.7	61.8

影响。选用 0.1% 甲酸水-甲醇为流动相时, 10 种成分的峰形和响应强度较好, 故选用 0.1% 甲酸水-甲醇作为流动相。

3.3 质谱条件的选择

本实验前期采用超高效液相色谱法检测复方地黄合剂中的 10 种成分, 但由于莫诺苷、芒果苷、栀子苷、马钱苷、芍药苷极性相近, 无法达到基线分离, 且在色谱柱中分离时间长。因此采用 UPLC-MS/MS, 正负离子切换的模式同时测定复方地黄合剂中 10 种成分的含量, 并优化去簇电压和碰撞能量。小檗碱、黄柏碱和特女贞苷在正离子模式下响应更好, 芒果苷、莫诺苷、马钱苷、芍药苷、栀子苷、黄芩苷和毛蕊花糖苷在负离子模式下响应更强。

4 结论

本实验建立了 UPLC-MS/MS 同时测定小檗碱、黄柏碱、特女贞苷、芒果苷、莫诺苷、马钱苷、芍药苷、栀子苷、黄芩苷和毛蕊花糖苷 10 种成分在复方地黄合剂中含量的方法。该方法样品前处理简便, 结果灵敏准确、重现性好, 分析时间短, 可用于复方地黄合剂的含量测定。

样品含量测定结果显示, 复方地黄合剂中黄

芩苷的含量最高, 符合该制剂黄芩苷含量不少于 1.5 mg/ml 的质控标准。小檗碱、黄柏碱、特女贞苷、芒果苷、莫诺苷、马钱苷、芍药苷、栀子苷和毛蕊花糖苷的含量稳定, 可作为考察复方地黄合剂质量标准的指标性成分。本实验建立的方法为复方地黄合剂的成分检测提供参考, 为其质量控制及质量标准提升提供依据。

【参考文献】

- [1] 倪娜, 苏恒, 孔祥阳. 浅谈中枢性性早熟的发病机制 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2021, 37(6): 727-732.
- [2] 王玲玲, 吕慧慧. 滋阴泻火方联合醋酸亮丙瑞林微球治疗对性早熟女童性激素水平、第二性征的影响 [J]. 新中医, 2023, 55(19): 125-129.
- [3] 杨春华, 赵天兰, 任盛, 等. 知柏地黄丸对性早熟女童身高、骨龄及下丘脑-垂体-性腺轴的调节效应分析 [J]. 中国性科学, 2023, 32(6): 113-116.
- [4] 王申东, 胡斯, 施路宁, 等. 两种抗早熟医院中药制剂的煎煮时间改进 [J]. 世界临床药物, 2010, 31(8): 486-489.
- [5] 张武标, 沈阳, 王申东, 等. 高效液相色谱法测定复方地黄合剂中黄芩苷的含量 [J]. 儿科药科学杂志, 2012, 18(10): 41-43.
- [6] 景晓平, 邹亚, 许丽雅, 等. 复方逍遥合剂治疗肝郁化火证及复方地黄合剂治疗阴虚火旺证女童特发性性早熟临床观察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(7): 167-172.
- [7] 张德静, 牛小彩. 复方地黄合剂及复方逍遥合剂中黄芩苷含量测定 [J]. 上海医药, 2017, 38(5): 66-70.

【收稿日期】 2023-12-28 【修回日期】 2025-01-16

【本文编辑】 崔俐俊